

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
16 de Agosto de 2001 (16.08.2001)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 01/58445 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷:
A61K 31/352, 35/78, A61P 35/00, 25/00

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES00/00450

(22) Fecha de presentación internacional:
22 de Noviembre de 2000 (22.11.2000)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P 200000323 11 de Febrero de 2000 (11.02.2000) ES

(71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo
US): UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
[ES/ES]; Rectorado, Avenida de Séneca, 2, E-28040
Madrid (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): GUZMAN

PASTOR, Manuel [ES/ES]; Facultad Cc. Biológicas,
Dpto. Bioquímica y Biología Molecular I, E-28040 Madrid
(ES). SANCHEZ GARCIA, Cristina [ES/ES]; Facultad
Cc. Biológicas, Dpto. Bioquímica y Biología Molecular
I, E-28040 Madrid (ES). GALVE ROPERH, Ismael
[ES/ES]; Facultad Cc. Biológicas, Dpto. Bioquímica y
Biología Molecular I, E-28040 Madrid (ES).

(81) Estados designados (nacional): AU, BR, CA, CN, JP,
MX, NO, NZ, SG, US.

(84) Estados designados (regional): patente europea (AT, BE,
CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE, TR).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: THERAPY WITH CANNABINOIDS IN THE TREATMENT OF CEREBRAL TUMOR

(54) Título: TERAPIA CON CANNABINOIDES PARA EL TRATAMIENTO DE TUMORES CEREBRALES

(57) Abstract: The therapy with cannabinoids in the treatment of cerebral tumors involves (intracranial or systematic) administration of (natural or synthetic) cannabinoids to (human or non-human) mammals having cerebral tumors. Activation of the specific receptors of the cannabinoids leads to selective death of the transformed cells. Regression or eradication of the cerebral tumors is achieved without any significant side-effects.

(57) Resumen: La terapia con cannabinoides para el tratamiento de tumores cerebrales consiste en la administración (intracraneal o sistémica) de cannabinoides (naturales o sintéticos) a mamíferos (humanos o no humanos) portadores de tumores cerebrales. Los cannabinoides conducen, mediante la activación de sus receptores específicos, a la muerte selectiva de las células transformadas. Se consigue así la regresión o erradicación de tumores cerebrales sin efectos colaterales significativos.

WO 01/58445 A1

Título**TERAPIA CON CANNABINOIDES PARA EL TRATAMIENTO DE TUMORES CEREBRALES**

5

Campo técnico de la invención

La presente invención se encuadra en el campo de la terapia de tumores cerebrales.

10 **Objeto de la invención**

La presente invención, según se recoge en esta memoria descriptiva, se refiere a la utilización terapéutica de los cannabinoides para el tratamiento de tumores cerebrales. Las terapias utilizadas hoy en día para el tratamiento de estos tumores (cirugía, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia, terapia

15 génica) suelen ser ineficaces o a lo sumo paliativas. La invención supone una aproximación técnicamente simple, carente de efectos colaterales notorios y altamente eficaz para el tratamiento de tumores cerebrales, incluidos los más malignos (glioblastomas).

20 **Antecedentes**

Dentro de los tumores cerebrales que afectan a los seres humanos, los glioblastomas son los más frecuentes (1 por 50.000 personas y año), malignos (mortalidad cercana al 100%) y de evolución más rápida (esperanza de vida de semanas/meses tras su diagnóstico). Hoy en día, el

25 tratamiento de los glioblastomas suele ser ineficaz o meramente paliativo, e implica técnicas tales como cirugía, radioterapia, quimioterapia e inmunoterapia (Louis, D.N. & Gusella, J.F., *Trends Genet.* 11, 412-415, 1995; Avgeropoulos, N.G. & Batchelor, T.T., *Oncologist* 4, 209-224, 1999). Además, la terapia génica ha comenzado a ser empleada como tratamiento

30 experimental de los glioblastomas, aunque hasta ahora ha proporcionado escasos resultados positivos (Martuza, R.L., *Nature Med.* 3, 1323, 1997). El ya de por sí poco probable éxito de estas aproximaciones terapéuticas suele

además verse complicado por factores como el rápido crecimiento, la notoria heterogeneidad, el alto nivel de infiltración y la extrema resistencia a quimioterapia que exhiben los glioblastomas (Maintz, D. *et al.*, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **56**, 1098-1104, 1997; Mason, W., Louis, D.N. & Cairncross, J.G., *J. Clin. Oncol.* **15**, 3423-3426; 1997; Martuza, *op. cit.*; Avgeropoulos & Batchelor, *op. cit.*). Parece claro por tanto que es altamente recomendable el desarrollo de terapias alternativas para el tratamiento de tumores cerebrales.

Los cannabinoides son compuestos que deben su nombre a que son sintetizados por la planta *Cannabis sativa* L. Estos compuestos, entre los que el Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC) destaca por sus elevadas potencia y abundancia, son los responsables de los efectos centrales y periféricos del consumo de marihuana (Pertwee, R.G., *Pharmacol. Ther.* **74**, 129-180, 1997; Felder, C.C. & Glass, M., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **38**, 179-200, 1998). Los cannabinoides de *C. sativa* (Fig. 1) llevan a cabo sus efectos debido a que son similares a determinadas moléculas producidas por los animales (incluidos los humanos) que probablemente desempeñan funciones importantes en el sistema nervioso. Estas moléculas se denominan por ello cannabinoides endógenos o endocannabinoides, y la anandamida (=araquidonoiletanolamida) es su principal representante (Di Marzo, V., Melck, D., Bisogno, T. & De Petrocellis, L., *Trends Neurosci.* **21**, 521-528, 1998; Martin, B.R., Mechoulam, R. & Razdan, R.K., *Life Sci.* **65**, 573-595, 1999). Es más, se han conseguido obtener en el laboratorio compuestos que mimetizan la acción de los cannabinoides naturales pero con una potencia mucho más elevada. Son los denominados cannabinoides sintéticos, uno de cuyos representantes es el WIN-55,212-2 (Fig. 2) (Pertwee, *op. cit.*; Barth, F., *Expert Opin. Ther. Patents* **8**, 301-313, 1998). Los cannabinoides, tanto los naturales como los sintéticos, actúan mediante su unión a receptores específicos de membrana (receptores de cannabinoides o de tipo CB), de los cuales se conocen hoy en día dos subtipos diferentes: CB₁ y CB₂ (Pertwee, *op. cit.*; Howlett, A. *et al.*, en: *The IUPHAR Compendium of Receptor Characterization and Classification*, eds. Godfraind, T., Humphrey, P., Ruffolo, R. & Vanhoutte, P., IUPHAR Media, pp. 97-104, 1998). No todos los

tejidos del organismo poseen estos receptores: se localizan principalmente en el sistema nervioso, y por eso los cannabinoides ejercen mayoritariamente sus efectos en el cerebro (Pertwee, *op. cit.*; Childers, S.R. & Breivogel, C.S., *Drug Alcohol Depen.* **51**, 173-187, 1998).

5 Existe hoy en día un gran número de estudios acerca de las posibles aplicaciones terapéuticas de los cannabinoides. Es más, en la actualidad ya se permite a los médicos en el Reino Unido y en diversos estados de los Estados Unidos prescribir THC o determinados cannabinoides sintéticos como estimulantes del apetito e inhibidores del vómito en pacientes con
10 SIDA o cáncer tratados crónicamente con quimioterapia (Grinspoon, L. & Bakalar, J.B., *JAMA* **273**, 1875-1876, 1995; Voth, E. & Schwartz, R., *Ann. Intern. Med.* **126**, 791-798, 1997). Entre los usos terapéuticos potenciales de los cannabinoides destacan los siguientes: (a) como agentes analgésicos se ha demostrado que actúan de forma altamente eficaz en la atenuación del
15 dolor agudo y crónico; (b) como agentes que reducen la actividad motora se están probando hoy en día en el tratamiento de los trastornos asociados a la enfermedad de Parkinson, el corea de Huntington y la esclerosis múltiple; (c) como agentes anticonvulsivantes se estudia su aplicación en el tratamiento de la epilepsia; (d) como agentes que disminuyen la presión intraocular
20 podrían utilizarse en el tratamiento del glaucoma (Voth y Schwartz, *op. cit.*; Manzanares, J. *et al.*, *Trends Pharmacol. Sci.* **20**, 287-294, 1999; Pop, E., *Curr. Opin. CPNS Invest. Drugs* **1**, 587-596, 1999; Sanudo-Pena, M.C., Tsou, K. & Walker, J.M., *Life Sci.* **65**, 703-713, 1999). Algunos de estos usos terapéuticos potenciales de los cannabinoides ya han sido patentados (ver
25 por ejemplo US4189491, US5939429, WO9711668, WO9832441 y WO9957106).

 Uno de los efectos más intrigantes e inexplorados de los cannabinoides es su capacidad para inhibir el crecimiento de células transformadas *in vitro*. Así, se ha demostrado que diversos cannabinoides
30 inhiben la proliferación de células de tumor de mama MCF-7 (De Petrocellis, L. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 8375-8380, 1998), de células de glioblastoma C6 (Sánchez, C., Galve-Roperh, I., Canova, C., Brachet, P. &

Guzmán, M., *FEBS Lett.* **436**, 6-10, 1998) y de células de tumor de próstata PC-3 (Ruiz, L., Miguel, A. & Díaz-Laviada, I., *FEBS Lett.* **458**, 400-404, 1999). Sin embargo, estos hallazgos en sistemas de cultivo celular nunca han sido hasta ahora observados *in vivo*, por lo que su significado biomédico es desconocido.

Descripción de la invención

La presente invención hace uso por primera vez de los cannabinoides para el tratamiento de tumores cerebrales, y se basa en nuestras observaciones originales de que los cannabinoides inducen una marcada regresión (que conlleva un alargamiento de la vida) e incluso la erradicación (que conlleva la curación) de glioblastomas en animales de laboratorio. Esta invención implica la utilización de una terapia técnicamente simple, carente de efectos colaterales notorios y, lo que es más importante, muy eficaz para el tratamiento de tumores cerebrales, que como se ha comentado anteriormente no pueden ser tratados hoy en día de manera satisfactoria con otras técnicas o compuestos. Los experimentos que han conducido a la presente invención se detallan a continuación.

Acción antitumoral de los cannabinoides en ratas

La inyección de células de glioblastoma C6 en el cerebro de rata se utiliza ampliamente como modelo experimental de tumor cerebral maligno (Barth, R.F., *J. Neurooncol.* **36**, 91-102, 1998). Se inocularon células de glioblastoma C6 directamente en el cerebro de ratas *Wistar*, y los tumores se visualizaron por resonancia magnética. Todos los animales que se dejaron sin tratar murieron uniformemente 12-18 días después de la inoculación de las células (Fig. 3a). Para evaluar el potencial antitumoral de los cannabinoides, 12 días después de la inoculación de las células se administró a un grupo de animales durante 7 días THC o WIN-55,212-2 a través de una cánula localizada en el sitio de inoculación. Los animales tratados con cannabinoides tuvieron una vida significativamente más larga que los animales control (Fig. 3a). Así, la administración de cannabinoides

consiguió incrementar la supervivencia a 19-35 días en 9/15 animales (tratamiento con THC) o a 19-43 días en 4/15 animales (tratamiento con WIN-55,212-2). Es más, los cannabinoides erradicaron completamente el tumor en 3/15 animales (tratamiento con THC) o en 5/15 animales (tratamiento con WIN-55,212-2). En la Fig. 3b se muestra una imagen de resonancia magnética de uno de los animales curados con THC; tras la administración del cannabinoide la masa tumoral desaparecía completamente, y en su lugar se observaba una zona hipointensa residual que se interpreta como una cicatriz fibrosa en el sitio de inoculación. No se observó recurrencia alguna en los 8 animales curados con cannabinoides.

Acción antitumoral de los cannabinoides en ratones inmunodeficientes

Para discernir si la acción antiproliferativa de los cannabinoides se debe a un efecto directo sobre las células tumorales o a un efecto indirecto mediado por una respuesta inmune, se inocularon subcutáneamente células de glioblastoma C6 en ratones deficientes en la recombinasa RAG-2 (RAG-2^{-/-}), que carecen de linfocitos T y B maduros (Shinkai, Y. *et al.*, *Cell* 68, 855-867, 1992). Como se muestra en la Fig. 4a, el tamaño de los tumores era extraordinariamente inferior en los animales tratados con THC o WIN-55,212-2 que en los animales control. En la Fig. 4b se muestran ejemplos de ratones portadores de tumores y de tumores diseccionados después del tratamiento con o sin cannabinoides durante 7 días.

Seguridad del tratamiento con cannabinoides *in vivo*

Se examinaron a continuación los posibles efectos secundarios del tratamiento con cannabinoides. Las ratas sin tumor y tratadas con cannabinoides no veían afectada en absoluto su supervivencia (Fig. 3a). Al igual que en los 8 animales antes mencionados cuyos tumores fueron erradicados con cannabinoides, el análisis minucioso por resonancia magnética de todos los animales sin tumor revelaba que el tratamiento con cannabinoides no producía ninguna señal de daño por necrosis, edema, infección, inflamación o trauma. Para descartar la posibilidad de que los

cannabinoides fueran tóxicos para las células nerviosas en división, se realizaron tinciones de TUNEL en la zona subventricular del cerebro de las ratas, que continúa en proliferación en el animal adulto. La administración de cannabinoides no sólo no produjo ningún efecto apoptótico significativo en el cerebro *in vivo*, sino que además el ligero marcaje observado en el caudado putamen de los animales control no era evidente en los animales tratados con cannabinoides.

Tanto en los animales sin tumor como en los portadores de tumor, los cannabinoides no indujeron ninguna alteración significativa de parámetros comportamentales como coordinación motora y actividad física. La ingesta de agua y alimento, así como la ganancia de peso, tampoco se vieron afectadas por los cannabinoides. Así mismo, en los análisis de sangre los parámetros bioquímicos (glucosa, urea, ácido úrico, creatinina, colesterol, bilirrubina) y los marcadores de daño tisular (alanina y aspartato aminotransferasas, γ -glutamilttransferasa, creatina quinasa, lactato deshidrogenasa) no resultaron afectados ni a lo largo del periodo de 7 días de administración ni hasta 2 meses después de la finalización del tratamiento con cannabinoides. Datos de otros autores apoyan la idea de que los cannabinoides no sólo no son compuestos tóxicos para las células nerviosas, sino que incluso las protegen de estímulos tóxicos tales como los agonistas glutamaérgicos (Skaper, S.D. *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 3984-3989, 1996; Shen, M. & Thayer, S.A., *Mol. Pharmacol.* **54**, 459-462, 1998), los agentes oxidantes (Hampson, A.J., Grimaldi, M., Axelrod, J. & Wink, D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 8268-8273, 1998) y la isquemia (Nagayama, T. *et al.*, *J. Neurosci.* **19**, 2987-2995, 1999).

Caracterización farmacológica de la acción antitumoral de los cannabinoides

Se llevaron a cabo experimentos encaminados a caracterizar farmacológicamente la muerte inducida por cannabinoides de células de glioblastoma C6 en cultivo. Agonistas sintéticos de elevada potencia como WIN-55,212-2, CP-55,940 y HU-210 inducían la muerte de estas células a

dosis menores que el THC, como cabía esperar de su mayor afinidad por los receptores de cannabinoides (Pertwee, *op. cit.*). Así, tras 5 días de exposición a cannabinoides, la viabilidad del glioblastoma C6 se veía reducida en un 50% a concentraciones de 20 nM WIN-55,212-2, 45 nM CP-55,940, 10 nM HU-210 y 480 nM THC (n=4). Ni el SR141716 (un antagonista selectivo de CB₁) ni el SR144528 (un antagonista selectivo de CB₂) (Shire, D. *et al.*, Life Sci. **65**, 627-635, 1999) eran capaces por separado de prevenir la muerte celular inducida por el THC. Sin embargo, cuando los dos antagonistas se añadían conjuntamente a las incubaciones se observaba una prevención eficaz de la muerte celular inducida por THC (Fig. 5a). De acuerdo con ello, el análisis por *Western blot* demostró que las células de glioblastoma C6 expresaban tanto el receptor CB₁ como el CB₂ (Fig. 5b).

Aplicación de la invención en otros supuestos

Los experimentos que han conducido a la presente invención se han llevado a cabo con ratas y ratones como animales portadores de tumores. Sin embargo, tanto por el diseño experimental empleado como por la similitud que exhiben los tumores cerebrales en distintos mamíferos (R.F. Barth, *op. cit.*), la invención puede aplicarse al tratamiento de tumores cerebrales en otros mamíferos, incluido el ser humano.

Los experimentos que han conducido a la presente invención se han llevado a cabo con glioblastomas como modelo de tumor cerebral. Sin embargo, por el diseño experimental que se ha utilizado para la inducción y tratamiento de los tumores, la invención puede aplicarse al tratamiento de otros tumores cerebrales, por ejemplo meduloepiteliomas, meduloblastomas, neuroblastomas, germinomas, carcinomas embrionarios, astrocitomas, astroblastomas, ependimomas, oligodendrogliomas, carcinomas plexales, neuroepiteliomas, pineoblastomas, ependimoblastomas, tumores neuroectodérmicos, meningiomas malignos, condrosarcomas, sarcomatosomas meningeales, melanomas malignos o schwannomas malignos.

Los experimentos que han conducido a la presente invención se han llevado a cabo con dos cannabinoides paradigmáticos, uno natural (THC) y otro sintético (WIN-55,212-2). En una realización preferida de la invención se utilizará el cannabinoide con efecto antiproliferativo más potente para un determinado tumor. Sin embargo, puesto que el efecto antiproliferativo de estos compuestos está mediado por los receptores de cannabinoides (receptores de tipo CB, Howlett *et al.*, *op. cit.*), la invención es aplicable a cualquier otro agonista de estos receptores, tanto cannabinoides de *C. sativa* (por ejemplo Δ^8 -tetrahidrocannabinol, cannabinol, cannabidiol) (Fig. 1) como cannabinoides sintéticos (por ejemplo HU-210, CP-55,940, CP-50,556) (Fig. 2) (Pertwee, *op. cit.*; F. Barth, *op. cit.*). También se incluyen en este apartado los medicamentos que contengan en su composición cualquier cannabinoide.

15

Los experimentos que han conducido a la presente invención se han llevado a cabo administrando intratumoralmente el cannabinoide. En una realización preferida de la invención ésta será la vía de administración elegida, ya que permite una elevada accesibilidad del cannabinoide al tumor. Sin embargo, puesto que la acción del cannabinoide es directa sobre el tumor y no parece afectar sustancialmente a sistemas periféricos, la vía de administración puede ser también sistémica, por ejemplo intraperitoneal, intravenosa u oral.

25

Los experimentos que han conducido a la presente invención se han llevado a cabo mediante la administración continua de una dosis de cannabinoide durante un tiempo determinado. En una realización preferida de la invención se optimizarán estos parámetros dependiendo de los requerimientos específicos del tratamiento: estado del paciente, tamaño y localización del tumor, número de tumores, etc. Así, por ejemplo, el modo de aplicación podrá ser continuo (modo preferido) o secuencial en una o varias

30

dosis por día. Esto hará obviamente variar las dosis de compuesto administradas y el tiempo total de duración del tratamiento.

Breve descripción de las figuras

5

Figura 1

Fórmula química de los principales cannabinoides de *C. sativa*

10

Figura 2

Fórmula química de los principales cannabinoides sintéticos

Figura 3

Acción antitumoral de los cannabinoides en ratas

15

(a) Curvas de supervivencia de ratas con tumores cerebrales. Se indujeron glioblastomas en 45 ratas (día 0); 15 animales no fueron tratados con cannabinoides (—), mientras que otros 15 se trataron con THC (—) y otros 15 con WIN-55,212-2 (····) entre los días 12 y 19. Los animales tratados con cannabinoides vivieron significativamente más tiempo que los controles ($P < 0.01$ por el test *log-rank*). Se administró así mismo THC y WIN-55,212-2 a 5 ratas cada uno en las que no se indujo tumor alguno (---).

20

(b) Imagen de resonancia magnética en proyecciones axial (superior) y coronal (inferior) del cerebro de una rata antes (izquierda) y después (derecha) del tratamiento con THC. Un glioblastoma de 100 mm³ (flecha) fue erradicado con 500 µg de THC. La imagen fue tomada 7 días después de la finalización del tratamiento con THC.

25

Figura 4

Acción antitumoral de los cannabinoides en ratones inmunodeficientes

30

(a) Se indujeron glioblastomas en 18 ratones. Cuando los tumores alcanzaron el tamaño deseado (día 0), 6 animales fueron tratados con

vehículo (o), mientras que otros 6 se trataron con THC (•) y otros 6 con WIN-55,212-2 (◻) durante 7 días. El tamaño de los tumores en los animales tratados con cannabinoides era significativamente menor que en los controles a todos los tiempos ($P < 0.01$ por el test t de Student).

- 5 (b) Ejemplos de glioblastomas en ratones (arriba) y diseccionados (abajo, barra: 1 cm) tras el tratamiento durante 7 días con vehículo, THC o WIN-55,212-2 (WIN).

10

Figura 5

Implicación de los receptores de cannabinoides en la muerte celular

- (a) Se cultivaron células de glioblastoma C6 durante 5 días en ausencia o presencia de $1 \mu\text{M}$ THC, $1 \mu\text{M}$ SR141716 (SR1) y/o $1 \mu\text{M}$ SR144528 (SR2) ($n=6$). *Significativamente diferente de las incubaciones sin adiciones ($P < 0.01$ por el test t de Student).

(b) Presencia de receptores de cannabinoides CB_1 y CB_2 en células de glioblastoma C6. La detección de los receptores se realizó por *Western blot* con anticuerpos específicos para cada uno de los dos receptores.

20

Modo de realización de la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente con los ejemplos que se exponen a continuación.

25

Ejemplo 1

Curación de glioblastomas en ratas

- Se anestesiaron ratas *Wistar* macho (250-300 g de peso corporal) con 3% isofluorano en una mezcla de oxígeno (0.8 l/min) y protóxido (0.4 l/min). Se prepararon 5×10^6 células de glioblastoma C6 en 100 μl de solución salina tamponada con fosfato (PBS) suplementada con 0.1% glucosa y se
- 30 inyectaron estereotóxicamente en el lóbulo fronto-parietal del hemisferio

cerebral derecho (4 mm a la derecha de bregma, 4.5 mm de profundidad desde el cráneo) (Izquierdo, M. *et al.*, *Gene Ther.* 2, 66-69, 1995). Las ratas recibieron dexametasona (2 mg/l) y tetraciclina (75 mg/kg de peso corporal) en el agua durante 3 días antes y 7 días después de la inoculación de las células. Se llevó a cabo un exhaustivo seguimiento de los tumores mediante resonancia magnética por métodos descritos por otros autores (Izquierdo *et al.*, *op. cit.*; Cortés, M.L., de Felipe, P., Martín, V., Hughes, M.A. & Izquierdo, M., *Gene Ther.* 5, 1499-1507, 1998).

La administración de cannabinoides a las ratas comenzó 12 días después de la inoculación de las células. En este momento, el tamaño medio de los tumores era de 70 mm³ (intervalo 25-100 mm³) estimado por resonancia magnética (Izquierdo *et al.*, *op. cit.*; Cortés, de Felipe, Martín, Hughes & Izquierdo, *op. cit.*). Los cannabinoides se administraron mediante una cánula situada en el lugar de inoculación del tumor y fijada al cráneo con cemento dental; un pequeño tornillo de acero inoxidable aseguraba la cánula y el cemento dental. La cánula se conectó subcutáneamente mediante un catéter a una mini-bomba osmótica (Alzet 2001) que operaba a un flujo de 1 µl/h durante 7 días. La bomba osmótica se rellenó con 500-2500 µg de THC o 50-250 µg de WIN-55,212-2 en 200 µl de PBS suplementado con 5 mg/ml de albúmina de suero bovino (BSA) deslipidizada y dializada. Las dosis de cannabinoides utilizadas dependieron de las características del tumor a tratar; las dosis mayores se emplearon para tumores grandes, densos e invasivos.

Como se observa en la Fig. 3a, todos los animales que se dejaron sin tratar murieron uniformemente 12-18 días después de la inoculación de las células. Los animales tratados con cannabinoides tuvieron una vida significativamente más larga que los animales control. Es más, los cannabinoides erradicaron completamente el tumor en un porcentaje significativo de animales. En la Fig. 3b se muestra una imagen de resonancia magnética de uno de los animales curados con THC; tras la administración del cannabinoide la masa tumoral desaparece

completamente, y se observa una zona hipointensa residual que se interpreta como una cicatriz fibrosa en el sitio de inoculación. No se observó recurrencia alguna en los animales curados con cannabinoides.

5

Ejemplo 2

Curación de glioblastomas en ratones inmunodeficientes

Se indujeron tumores en ratones RAG-2^{-/-} mediante inoculación subcutánea de 5×10^6 células de glioblastoma C6 en 100 μ l de PBS suplementado con 0.1% glucosa. Unos 10 días después, cuando el volumen medio de los tumores era de 250 mm³ (intervalo 200-300 mm³), los animales se dividieron al azar en 3 grupos y se les inyectó durante 7 días vehículo, 500 μ g de THC o 50 μ g de WIN-55,212-2 por día en 100 μ l de PBS suplementado con 5 mg/ml de BSA deslipidizada y dializada. Las dimensiones de los tumores se midieron con un calibrador y se calculó su volumen como $(4\pi/3) \times (\text{anchura}/2)^2 \times (\text{longitud}/2)$.

Como se muestra en la Fig. 4a, el tamaño de los tumores era extraordinariamente inferior en los animales tratados con THC o WIN-55,212-2 que en los animales control. En la Fig. 4b se muestran ejemplos de ratones portadores de tumores y de tumores diseccionados después del tratamiento con o sin cannabinoides durante 7 días.

20

Ejemplo 3

Implicación de los receptores de cannabinoides en la muerte de células de glioblastoma

Se cultivaron a 37°C y 5% CO₂ células de glioblastoma C6 en medio F12 suplementado con suero fetal de ternera al 10%; 24 h antes del comienzo del experimento las células se transfirieron a medio F12 libre suero y suplementado con insulina (5 μ g/ml), transferrina (5 μ g/ml), selenito sódico (5 μ g/ml) y BSA deslipidizada y dializada (10 mg/ml). El medio se renovó cada 48 h y la viabilidad celular se determinó mediante el método del MTT (Sánchez, C., Galve-Roperh, I., Canova, C., Brachet, P. & Guzmán, M.,

25

30

op. cit.). Como se observa en la Fig. 5a, el THC era capaz de inducir la muerte de las células de glioblastoma C6. Además, cuando se añadían simultáneamente al medio SR141716 (antagonista selectivo de CB₁) y SR144528 (antagonista selectivo de CB₂) se prevenía la muerte celular inducida por el THC.

Para comprobar que ambos receptores estaban presentes en las células C6, las células se lavaron con PBS, se rascaron las placas en medio de lisis y se obtuvo la fracción particulada mediante centrifugación a 40.000g durante 60 min (Sánchez, C., Galve-Roperh, I., Canova, C., Brachet, P. & Guzmán, M., op. cit.). Se sometieron las muestras a electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico y las proteínas se transfirieron de los geles a membranas de nitrocelulosa. Las membranas se bloquearon con BSA deslipidizada y dializada al 1%, y se incubaron con un anticuerpo frente a los residuos 1-14 del receptor CB₁ de rata (diluido 1:5000) o con un anticuerpo frente a los residuos 350-361 del receptor CB₂ humano (diluido 1:2000). Las muestras se sometieron finalmente a revelado con un "kit" de electroquimioluminiscencia (Amersham, Bucks, Reino Unido). Como muestra la Fig. 5b, las células de glioblastoma C6 expresaban tanto el receptor CB₁ como el CB₂.

20

Ejemplo 4

Seguridad del tratamiento con cannabinoides *in vivo*

Se administraron los cannabinoides (2500 µg de THC o 250 µg de WIN-55,212-2) a ratas sin tumores durante 7 días tal y como se ha descrito anteriormente. Las ratas fueron entonces sacrificadas y sus cerebros se fijaron con 4% paraformaldehído en PBS. La muerte por apoptosis se determinó en secciones del cerebro de 40 µm de espesor utilizando un "kit" de tinción TUNEL de acuerdo con las instrucciones del suministrador (Boehringer, Mannheim, Alemania). El marcaje de hebras de DNA con desoxiuridina trifosfato marcada con fluoresceína se visualizó mediante un microscopio confocal (longitud de onda de excitación: 488 nm, longitud de

30

onda de emisión: 525 nm). La intensidad del láser y la sensibilidad del fotodetector se mantuvieron constantes para permitir la comparación entre tratamientos. Se analizaron al menos 5 campos ópticos por animal.

- Se realizaron tinciones de TUNEL en la zona subventricular del cerebro de las ratas, que continúa en proliferación en el animal adulto. La administración de cannabinoides no sólo no produjo ningún efecto apoptótico significativo en el cerebro *in vivo*, sino que además el ligero marcaje observado en el caudado putamen de los animales control no se observaba en los animales tratados con cannabinoides.

R ivindicaciones

1.- Uso de cannabinoides naturales y sintéticos en la fabricación de un medicamento para el tratamiento terapéutico, en mamíferos incluyendo
5 seres humanos, de tumores cerebrales seleccionados del grupo que comprende: glioblastomas, meduloepiteliomas, meduloblastomas, neuroblastomas, germinomas, carcinomas embrionarios, astrocitomas, astroblastomas, ependimomas, oligodendrogliomas, carcinomas plexales, neuroepiteliomas, pineoblastomas, epandimoblastomas, tumores
10 neuroectodérmicos, meningiomas malignos, condrosarcomas, sarcomatosomas meningeales, melanomas malignos y schwannomas malignos.

2.- Uso según la reivindicación 1, en el que los tumores cerebrales
15 son glioblastomas.

3.- Uso según las reivindicaciones 1 y 2, en el que los cannabinoides naturales se seleccionan del grupo formado por: Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), Δ^8 -tetrahydrocannabinol, cannabinol y cannabidiol.
20

4.- 'Uso según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el cannabinoide natural es Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC).

5.- Uso según las reivindicaciones 1 y 2, en el que los cannabinoides sintéticos se seleccionan del grupo formado por: WIN-55,212-2, HU-210, CP-
25 55,940 y CP-50,556 (levonantradol).

6.- Uso según las reivindicaciones 1 y 5, en el que el cannabinoide sintético es WIN-55,212-2.
30

7.- Medicamento para el tratamiento, en mamíferos incluyendo seres humanos, de tumores cerebrales seleccionados del grupo que comprende: glioblastomas, meduloepiteliomas, meduloblastomas, neuroblastomas, germinomas, carcinomas embrionarios, astrocitomas, astroblastomas, 5 ependimomas, oligodendrogliomas, carcinomas plexales, neuroepiteliomas, pineoblastomas, epandimoblastomas, tumores neuroectodérmicos, meningiomas malignos, condrosarcomas, sarcomas meningeales, melanomas malignos y schwannomas malignos, caracterizado porque comprende, como principio activo, un cannabinoide natural o sintético, y un 10 excipiente farmacéuticamente aceptable.

8.- Medicamento según la reivindicación 7, en el que el cannabinoide natural se selecciona del grupo formado por: Δ^9 -tetrahidrocannabinol (THC), Δ^8 -tetrahidrocannabinol, cannabinol y cannabidiol.

15

9.- Medicamento según la reivindicación 7, en el que el cannabinoide sintético se selecciona del grupo formado por: WIN-55,212-2, HU-210, CP-55,940 y CP-50,556 (levonantradol).

20

10.- Medicamento según una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en el que el excipiente es uno adecuado para administración intratumoral (intracraneal) o sistémica, tal como oral, intravenosa o intraperitoneal.

25

11.- Medicamento según la reivindicación 10, en el que el excipiente para administración intratumoral es una solución salina tamponada con fosfato (PBS) suplementada con albúmina de suero de bovino (BSA) deslipizada y dializada.

12.- Medicamento según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 30 11, en el que la concentración del cannabinoide en el líquido de

administración intratumoral es de 10 a 10000 $\mu\text{g/ml}$ para el cannabinoide natural y de 1 a 1000 $\mu\text{g/ml}$ para el cannabinoide sintético.

- 5 13.- Procedimiento para el tratamiento terapéutico, en mamíferos
que comprende: glioblastomas, meduloepiteliomas, meduloblastomas,
neuroblastomas, germinomas, carcinomas embrionarios, astrocitomas,
astroblastomas, ependimomas, oligodendrogliomas, carcinomas plexales,
10 neuroepiteliomas, pineoblastomas, epandimoblastomas, tumores
neuroectodérmicos, meningiomas malignos, condrosarcomas,
sarcomatosomas meningeales, melanomas malignos y schwannomas
malignos, caracterizado porque comprende administrar, al animal afectado
por uno de dichos tumores, una cantidad terapéuticamente eficaz de un
medicamento como el definido en una cualquiera de las reivindicaciones 7 a
15 12.

14.- Procedimiento según la reivindicación 13, caracterizado porque la
administración se efectúa por vía intratumoral.

- 20 15.- Procedimiento según la reivindicación 14, caracterizado porque la
cantidad administrada de cannabinoide (principio activo) varía de 100 a
50000 μg para los cannabinoides naturales y de 10 a 5000 μg para los
cannabinoides sintéticos.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT / ES / 00 / 00450

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

CIP⁷ A61K 31/352. 35/78, A61P 35/00. 25/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

CIP⁷ A61K A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	HARRIS, L.S. et al.: "Retardation of tumor growth by Δ -9 tetrahydrocannabinol", The Pharmacologist (1974), vol. 16 (2), pág. 259, see abstract	1, 3, 7, 8
X	HARRIS, L.S. et al.: "Anti-tumor properties of cannabinoids", Braude, M.C. & Stephen szara (ed) 'Pharmacology of marihuana', vol. 1 y 2 -A monograph of the National Institute of Drug Abuse. Proceedings of the Meeting Savannah, GA, USA, Dic. 3-6, 1974. Illus. Raven Press: New York, NY, USA, ISBN 0-89004-067-2, 1976, pp.: 749-762, the all document. see in particular. page 753, lines 4-10	1, 3, 7, 8
X	BAEK SEUNG-HWA, et al.: "Synthesis and antitumor activity of cannabigerol", Archives of Pharmacol. Res. (Seoul), 1996, vol. 19 (3), pp.: 228-230, see page 228, last paragraph and page 229, first paragraph	1

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 February 2001 (21.02.01)

Date of mailing of the international search report

02 March 2001 (02.03.01)

Name and mailing address of the ISA/

S.P.T.O.

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 00/00450

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BAEK SEUNG-HWA, et al.: "Boron trifluoride etherate on silica-A modified Lewis acid reagent (VII). Antitumor activity of cannabigerol against human oral epitheloid carcinoma cells", Archives of Pharmacol. Res. (Seoul), June 1998, vol. 21 (3), pp.: 353-356, see pages 354 - 356 "Results and Discussion"	1
A	RUIZ, L. et al.: "Δ-9 tetrahydrocannabinol induces apoptosis in human prostate PC-3 cells via a receptor-independent mechanism", FEBS Lett. (1999), vol. 458 (3), pp.: 400-404, ISSN: 0253-5823	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT / ES / 00 / 00450

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **13 - 15**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/ ES 00/00450

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁷ A61K 31/352, 35/78, A61P 35/00, 25/00

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁷ A61K A61P

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, BIOSIS, MEDLINE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	HARRIS, L.S. et al.: "Retardation of tumor growth by Δ-9 tetrahydrocannabinol", The Pharmacologist (1974), vol. 16 (2), pág. 259, ver resumen	1, 3, 7, 8
X	HARRIS, L.S. et al.: "Anti-tumor properties of cannabinoids", Braude, M.C. & Stephen szara (ed) 'Pharmacology of marihuana', vol. 1 y 2 -A monograph of the National Institute of Drug Abuse. Proceedings of the Meeting Savannah, GA, USA, Dic. 3-6, 1974. Illus. Raven Press: New York, NY, USA, ISBN 0-89004-067-2, 1976, pp.: 749-762, todo el documento, ver en particular, pág. 753, líneas 4-10	1, 3, 7, 8
X	BAEK SEUNG-HWA, et al.: "Synthesis and antitumor activity of cannabigerol", Archives of Pharmacol. Res. (Seoul), 1996, vol. 19 (3), pp.: 228-230, ver pág. 228, último párrafo y pág. 229, primer párrafo.	1

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☐ Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo

- * Categorías especiales de documentos citados:
- "A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.
- "E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.
- "L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).
- "O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.
- "P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.
- "T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
- "X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
- "Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
- "&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 21 Febrero 2001 (21.02.2001)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional
02 MAR 2001 02.03.01

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.
C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.
n° de fax +34 91 3495304

Funcionario autorizado
Alfonso Maquedano
n° de teléfono + 34 91 3495474

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 00/00450

C (Continuación).

DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
<p>X</p> <p>A</p>	<p>BAEK SEUNG-HWA, et al.: "Boron trifluoride etherate on silica-A modified Lewis acid reagent (VII). Antitumor activity of cannabigerol against human oral epitheloid carcinoma cells", Archives of Pharmacol. Res. (Seoul), June 1998, vol. 21 (3), pp.: 353-356, ver pág 354-356 "Results and Discussion"</p> <p>RUÍZ, L. et al.: "Δ-9 tetrahydrocannabinol induces apoptosis in human prostate PC-3 cells via a receptor-independent mechanism", FEBS Lett. (1999), vol. 458 (3), pp.: 400-404, ISSN: 0253-5823</p>	<p>1</p>

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 00/00450

Recuadro I Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (Continuación del punto 1 de la primera hoja)

De conformidad con el artículo 17.2.a), algunas reivindicaciones no han podido ser objeto de búsqueda por los siguientes motivos:

1. ☒ Las reivindicaciones n°: 13-15 se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber: aunque se refieren a un método de tratamiento terapéutico del cuerpo humano o animal, la búsqueda se ha realizado y se ha basado en los efectos atribuidos a los compuestos.
2. ☐ Las reivindicaciones n°: se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:
3. ☐ Las reivindicaciones n°: son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la regla 6.4.a).

Recuadro II Observaciones cuando falta unidad de invención (Continuación del punto 2 de la primera hoja)

La Administración encargada de la Búsqueda Internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:

1. ☐ Dado que todas las tasas adicionales han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. ☐ Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda pueden serlo sin un esfuerzo particular que justifique una tasa adicional, esta Administración no ha invitado al pago de ninguna tasa de esta naturaleza.
3. ☐ Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones n°:
4. ☐ Ninguna de las tasas adicionales solicitadas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones n°:

Indicación en cuanto a la reserva ☐ Las tasas adicionales han sido acompañadas de una reserva por parte del solicitante.

☐ El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna reserva.